

ARTÍCULO ORIGINAL

Paralelismo en inmunoensayos: dos abordajes aplicados a la determinación de anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina

Parallelism in immunoassays: two approaches applied to the determination of anti-deamidated gliadin peptide antibodies

Cárdenas Delgado, Víctor Manuel^{1,2*}; Nuñez, Myriam³

¹Sección de Virología y Autoinmunidad, Laboratorio Mantel. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Medicina. Fundación Barceló. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³Cátedra de Matemática, Departamento de Fisicomatemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Cárdenas Delgado, Víctor Manuel. Sección de Virología y Autoinmunidad, Laboratorio Mantel, Marcelo T. de Alvear 2263 CP 1122, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; victor.cardenas@manlab.com.ar

Resumen Introducción: el análisis de paralelismo en un ensayo de ELISA examina si los calibradores se comportan como el analito endógeno frente a los inmunorreactantes del kit. Si la reactividad es comparable, es válida su aplicación con fines semicuantitativos en el área diagnóstica. Objetivo: analizar el paralelismo entre dos inmunoensayos comerciales ELISA como parte de un programa de verificación operativa para determinación de anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina de clase IgA e IgG (PDG-A y PDG-G). Materiales y métodos: se procesaron cuatro muestras: M1 a M4. Para el análisis del paralelismo entre 1) muestras y estándares y 2) muestras entre sí, se emplearon dos estrategias: en la primera, se ajustó un modelo logístico de 4 parámetros (4PL) a muestras y estándares para después linealizar los datos con la transformación Logit-Log. Luego, se comparó la similitud entre el coeficiente de Hill y la pendiente de las rectas por ANOVA. En el segundo enfoque, basado sobre el coeficiente de variación [CV], se analizó el paralelismo entre muestras. Usando diluciones seriadas de cada muestra, se interpolaron las densidades ópticas en la curva de calibración y se corrigió por factor de dilución: el nivel de anticuerpos obtenido debería ser consistente en el rango de diluciones explorado y no exhibir desviaciones por fuera de valores prefijados para un CV de 20%. Resultados: los dos abordajes fueron congruentes, M1 no reacciona de manera predecible con el kit PDG-A, mientras que M3 tampoco lo hace con el kit PDG-G. El análisis de las pendientes parece mostrar una sensibilidad exagerada en la detección de desvíos del paralelismo. Conclusiones: se recomienda dar prioridad a la evaluación gráfica de las curvas 4PL y abandonar el uso de las pruebas basadas sobre la hipótesis de similitud de parámetros en favor del método basado sobre el CV%.

Palabras clave: ELISA, inmunoensayo, paralelismo, diagnóstico, estándares.

Abstract Introduction: Parallelism analysis examines whether the calibrators behave in the same manner as the endogenous analyte against the immunoreactants kit. Once confirmed, the kit can be applied for semiquantitative purposes in the diagnostic field. Objectives: To analyze ELISAs parallelism as part of an operative verification program of two commercial immunoassays that quantitate anti-deamidated gliadin peptide antibodies of IgA and IgG class (DGP-A and DGP-G). Materials and methods: Four human samples termed M1 to M4 were processed. To analyze parallelism between samples and standards, a logistic four-parameter model (4PL) was adjusted to samples and standards, and then the data were linearized with the aid of Logit-Log transformation. ANOVA was used to compare the similarity between Hill coefficient (4PL) and slopes (linear adjustment). Then, to analyze parallelism among samples, we used an approach based on the variation coefficient (VC%). By processing serial dilutions of each sample, optical densities were interpolated in the calibration curve and the resulting concentrations were dilution-corrected. Antibody levels obtained from this inverse procedure should remain consistent in the dilution range explored, without deviations from the tolerable VC% value. Results: Both approaches agreed in that M1 did not react in a predictable fashion with the DGP-A kit. The same conclusion was drawn from M3 analysis with the DGP-G kit. Slope analysis showed an exaggerated sensitivity when detecting parallelism deviations. Conclusions: It is recommended to prioritize graphical evaluation of 4PL curves and set aside the parameter similarity-based tests in favor of the VC%-based method.

Keywords: ELISA, immunoassay, diagnostics, parallelism, standards.

Introducción

La técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA), de uso tan extendido en el campo de la serología, brinda una estimación semicuantitativa de biomarcadores de importancia clínica. Dentro de la esfera de estos biomarcadores, se encuentran los anticuerpos con especificidad de unión definida cuyos niveles circulantes correlacionan con eventos fisiopatológicos, tales como inmunizaciones, procesos infecciosos o recidivas en enfermedades autoinmunes.¹ Así, su determinación se ha consagrado como una valiosa herramienta para los procesos de toma de decisiones inscriptos en el marco de complejos algoritmos de la práctica clínica. En este contexto, desde el laboratorio de inmunología es esencial contar con procedimientos que no sólo den certeza acerca del desempeño de los inmunoensayos disponibles comercialmente, sino que, además, definan sus limitaciones.² En este artículo se plantea un esquema de verificación operativa del paralelismo aplicado a dos inmunoensayos comerciales para detección de anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina de clase IgA e IgG (PDG-A y -G), de uso corriente en el laboratorio clínico.

Hay una creciente demanda analítica sobre las determinaciones que integran el panel de pruebas diagnósticas de enfermedad celíaca: su elevada prevalencia, estimada en el 1 % de la población, sumada a iniciativas de organizaciones civiles para que se legisle sobre la materia justifica la trascendencia sanitaria que ha cobrado la detección precoz en individuos de alto riesgo. Dentro de las pruebas serológicas disponibles, se recomienda realizar el cribado por medio de la detección de anticuerpos antitransglutaminasa y antiendomiso³⁻⁴, combinación que por su especificidad y sensibilidad ha probado ser eficiente en la tarea de diferenciar a la población afectada por enfermedad celíaca de la población normal. Sin embargo, estos anticuerpos de buen desempeño en diagnóstico no son adecuados para monitorear la adherencia estricta del paciente a la dieta libre de gluten⁵, condición necesaria para minimizar el riesgo de mortalidad a largo plazo derivada de complicaciones oncológicas tales como el linfoma⁶. No obstante, en los últimos años, la determinación de los niveles de anticuerpos PDG-A y -G por ELISA ha demostrado tener una sensibilidad superior a los anticuerpos anti-transglutaminasa tisular y antigliadina en la detección de transgresiones alimentarias en la población pediátrica⁵, lo que justifica su incorporación como herramienta de monitoreo en numerosos servicios de inmunoserología.

La magnitud de la señal analítica en el ELISA depende de la reactividad del analito con componentes críticos del kit. En contraste con métodos cuantitativos de uso corriente en química clínica, esta señal no constituye una determinación directa de su masa, sino que depende de características de, por lo menos, una reacción antígeno-anticuerpo. Sabiendo que el analito está conformado por una población de anticuerpos cuya biosíntesis deriva de una respuesta inmune humoral de naturaleza polyclonal, es preciso reconocer el alto grado de heterogeneidad en sus parámetros de interacción inmunoquímicos.

Por otro lado, los estándares que se usan para construir

la curva de calibración no sólo son heterogéneos en cuanto a su composición, sino que, muchas veces, están insuficientemente caracterizados en los certificados de análisis que acompañan los kits comerciales. Otros niveles de complejidad se suman a la cuestión, si se considera la respuesta humoral inmadura de pacientes pediátricos, tal vez no comparable a la de adultos, y su potencial impacto en la señal. Por lo expuesto, cabe la posibilidad de que el material de referencia de los ELISA no sea representativo del analito endógeno desde el punto de vista inmunoquímico.⁷⁻⁸ Esto cuestiona la noción según la cual es válido interpolar señales en la curva estándar con fines semicuantitativos y, por lo tanto, también pone en duda la calidad de los resultados analíticos derivados del ensayo.

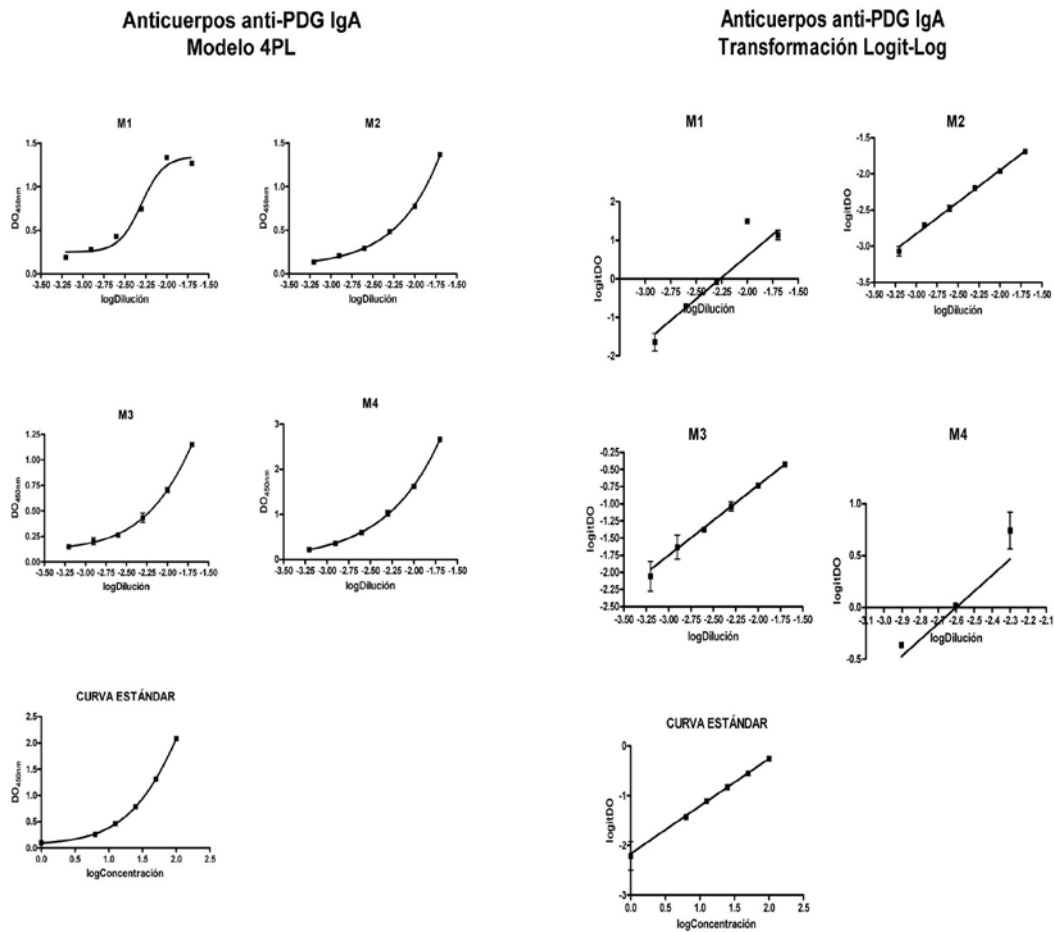
El análisis de paralelismo aborda estas cuestiones al examinar si los calibradores mimetizan el comportamiento del analito endógeno frente a los inmunorreagentes del kit. Si la reactividad es comparable, las curvas dosis -respuesta del analito y del estándar difieren únicamente en un desplazamiento horizontal⁹ y es válida la aplicación del kit con fines semicuantitativos. Pese al reconocimiento de su importancia crítica en etapas precoces del desarrollo de las técnicas de ELISA, hay discrepancia en la literatura en lo referido a la manera de conducir los experimentos de paralelismo y a cuáles deberían ser los criterios de aceptación o rechazo de un inmunoensayo diagnóstico.¹⁰

En este artículo, se plantea un esquema de verificación operativa del paralelismo aplicado a dos inmunoensayos comerciales para detección de anticuerpos contra los péptidos de gliadina desaminados, anti-PDG de clase IgA y anti-PDG de clase IgG. El análisis se articula en torno a dos enfoques: en primer lugar, aquel basado sobre las pruebas de significancia dependientes del valor p aplicado a parámetros derivados de ajustes de regresión tanto lineal como no lineal y, en segundo lugar, a una evaluación de la variabilidad en los resultados del cálculo inverso de niveles de analito contra un valor prefijado (CV = 20 %). Se analiza la congruencia entre estos abordajes alternativos y se sugieren lineamientos para que, dado el caso, el profesional bioquímico implemente desde una postura crítica su propio programa de verificación de este importante aspecto de los inmunoensayos en fase sólida.

Materiales y métodos

Se siguieron dos abordajes para el estudio del paralelismo: en primer lugar, se examinó el paralelismo entre muestras y calibradores empleando una prueba ANOVA para evaluar similitud de parámetros entre curvas dosis - respuesta. En este esquema de trabajo, se analizan parámetros descriptivos de los ajustes efectuados sobre la distribución de datos de las muestras y los estándares. Una vez comprobado que no difieren significativamente, se puede asumir que se cumple la condición de paralelismo entre las curvas.

El segundo enfoque indaga en el fenómeno de paralelismo entre muestras, siguiendo un procedimiento en el que, además, se examina la selectividad del ensayo y efecto de potenciales interferentes de la matriz.¹⁰ Se parte, en este caso, de la premisa según la cual en toda técnica inmunoquímica la

Figura 1. Anticuerpos IgA anti péptidos de gliadina desaminados (anti-PDG IgA).

► Panel izquierdo. Ajustes logísticos de 4 parámetros (4PL) sobre la distribución de datos de las muestras M1 a M4 y los estándares (curva estándar) para la prueba de ELISA que detecta anticuerpos anti - péptido deaminado de gliadina de clase IgA (PDG-A). Panel derecho. Regresión lineal sobre la distribución de datos de la transformación Logit - Log para las muestras M1 a M4 y los estándares (curva estándar). Se trabajó con la prueba de ELISA PDG-A.

selectividad no es absoluta: la señal analítica global depende de la interacción de elementos del ensayo con componentes de la matriz biológica y con el analito. El estudio del paralelismo entre muestras permite caracterizar la influencia de estos constituyentes de la matriz en los resultados.

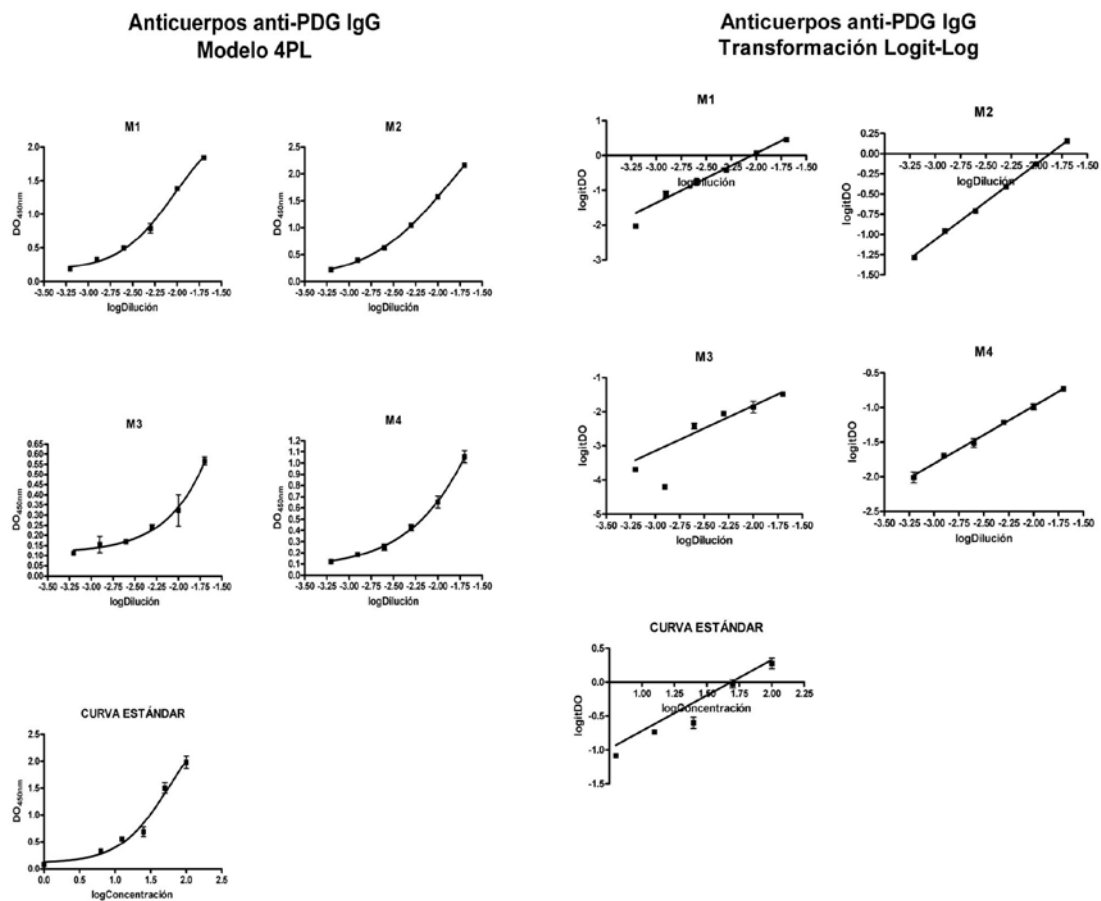
Para cumplir este objetivo, resultó adecuado el método basado sobre el cálculo inverso de niveles de anticuerpo para cada una de las diluciones seriadas de las muestras analizadas por ELISA. La excesiva variabilidad en las concentraciones finales calculadas siguiendo este procedimiento revelarían efectos de la matriz debido a interacciones espurias entre elementos del kit e interferentes, muchas veces de identidad desconocida.

Se trabajó con dos kits de ELISA disponibles comercialmente para determinación semicuantitativa de los niveles de anticuerpos anti - péptido deaminado de gliadina de clase IgA y anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina de clase IgG (PDG-A, PDG-G respectivamente; ORGENTEC Diagnostika, Mainz, GE). Los ensayos se ejecutaron de manera semiautomatizada con el analizador Alisei (RADIM Diagnostics, Freiburg, GE). El análisis

estadístico se llevó a cabo con el software *GraphPad Prism v 4.03* (GraphPad Software, Inc.).

Se procesaron muestras de suero de adultos obtenidas por punción venosa en ausencia de anticoagulantes. Se procuró que las muestras seleccionadas no presentaran interferencias macroscópicas, tales como fenómenos de hemólisis, hiperbilirrubinemia o hiperlipemia. Además, el título de anticuerpos anti-PDG de clase IgA e IgG debía encontrarse en un nivel tal que facilitase la interpolación de la señal de densidad óptica (DO) en la curva de calibración correspondiente: si el nivel de analito endógeno está convenientemente alejado de los límites superior e inferior de cuantificación del método, se previene el incremento indeseado del coeficiente de variación en las determinaciones.¹¹ El título adecuado para el estudio es todo aquel que esté alejado de los límites de cuantificación. Se diluyeron las muestras de suero de forma seriada a 6 niveles¹², según los factores 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600, con el diluyente provisto por el kit y se llevó a cabo la técnica, según las recomendaciones del fabricante tal como constan en el inserto, a excepción de la etapa de siembra de la muestra, en

Figura 2. Anticuerpos IgG anti péptidos de gliadina desaminados (anti-PDG IgG).



► Panel izquierdo. Ajustes logísticos de 4 parámetros (4PL) sobre la distribución de datos de las muestras M1 a M4 y los estándares (curva estándar) para la prueba de ELISA que detecta anticuerpos anti - péptido deaminado de gliadina de clase IgG (PDG-G). Panel derecho. Regresión lineal sobre la distribución de datos de la transformación Logit-Log para las muestras M1 a M4 y los estándares (curva estándar). Se trabajó con la prueba de ELISA PDG-G.

la que se dispensó en el pocillo de la microplaca la dilución en estudio. El fabricante sugiere procesar toda muestra de suero por el método de dilución única a un nivel 1/100, por lo que se consideró el resultado obtenido a partir de esta dilución como la concentración nominal de las muestras. Todas las diluciones se analizaron por triplicado.

Para el análisis del paralelismo entre muestras y estándares, se representaron los datos de DO vs. log de dilución para las muestras, mientras que para los estándares se procesaron las DO vs. log de concentración (concentración declarada por el fabricante). A partir de la distribución aparentemente simétrica de los datos, tanto de las muestras como de los calibradores, se decidió ajustar un modelo de regresión no lineal logístico de 4 parámetros (4PL). Este ajuste dio lugar a una curva sigmoidea de acuerdo con la expresión:

$$DO = D + \frac{(A - D)}{1 + (X/C) \exp E} \quad (1)$$

A y D representan las asíntotas superiores e inferiores de la curva sigmoidea, respectivamente; X corresponde a la dilución del punto de inflexión de la curva en torno al cual existe simetría y E es la pendiente o coeficiente de Hill.

Una vez obtenido el ajuste, se determinó el paralelismo en-

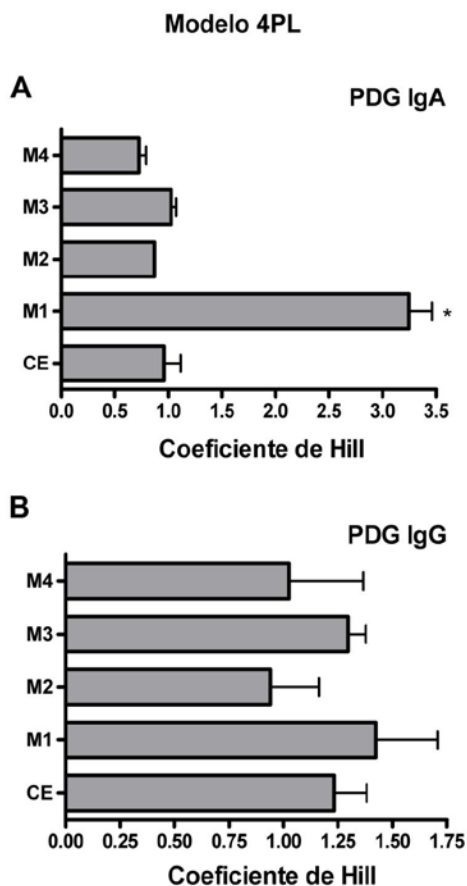
tre las curvas 4PL de las muestras y estándares a partir de un procedimiento de ANOVA basado sobre el análisis de las diferencias en la pendiente de Hill.¹³ Para continuar el análisis de paralelismo bajo el primer abordaje, se ajustaron a una recta los datos de las muestras y estándares al aplicar la transformación Logit-Log a los valores de DO¹⁴ según:

$$\text{logit DO} = \log \left\{ \frac{DO - D}{A - DO} \right\} \quad (2)$$

A y D representan las asíntotas superiores e inferiores de la curva logística. Una vez que se representaron los valores de logit DO vs. log dilución (para las muestras) y logit DO vs log concentración (para los estándares) se consiguió ajustar con éxito un modelo lineal de la forma:

$$\text{log DO} = b + m \log X \quad (3)$$

En ella, b es la ordenada al origen, X, la dilución (muestras) o concentración declarada (estándares) y m, la pendiente de la recta. El ajuste del modelo lineal permitió hacer inferencias acerca de la similitud entre las pendientes de las rectas para las muestras en estudio y los estándares, nuevamente por el método basado en la prueba de ANOVA. El empleo de esta operación, que asume la pérdida de las asíntotas en la representación gráfica, se ha descrito en literatura como trans-

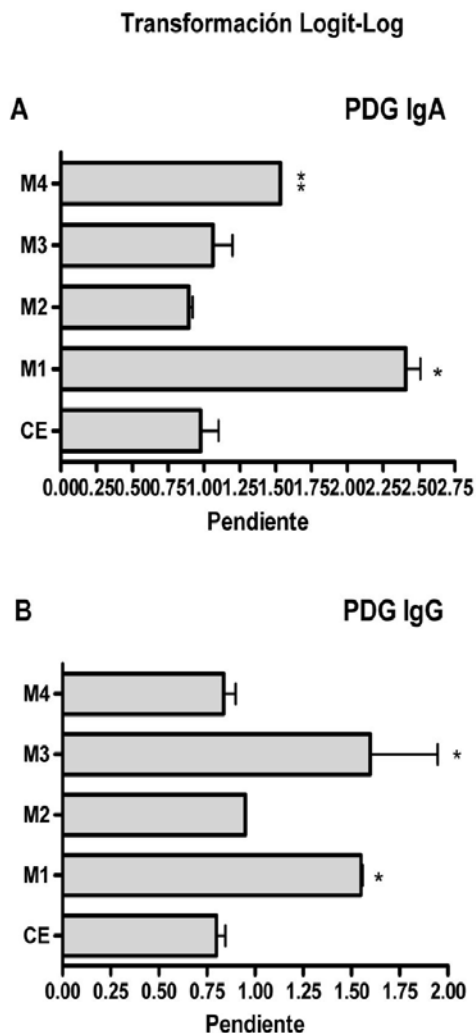
Figura 3. Representación del coeficiente o pendiente de Hill derivado de los ajustes 4PL.

► A. Representación del coeficiente o pendiente de Hill derivado de los ajustes 4PL para las muestras M1-M4 y la curva estándar (CE) en el trabajo con el kit PDG-A. Se compararon las pendientes de M1- M4 con la pendiente CE para analizar desvíos del paralelismo por la prueba de ANOVA de un factor. * $p < 0,01$.

► B. Representación del coeficiente o pendiente de Hill derivada de los ajustes 4PL para las muestras M1- M4 y la curva estándar (CE) en el trabajo con el kit PDG-G. Se compararon las pendientes de M1- M4 con la pendiente CE para analizar desvíos del paralelismo por la prueba de ANOVA de un factor. No se registraron diferencias significativas.

formación Logit - Log totalmente especificada.¹¹ Teniendo en cuenta la falta de homogeneidad en las varianzas (heterocedasticidad), la regresión lineal se hizo por el método de mínimos cuadrados ponderados.¹⁴

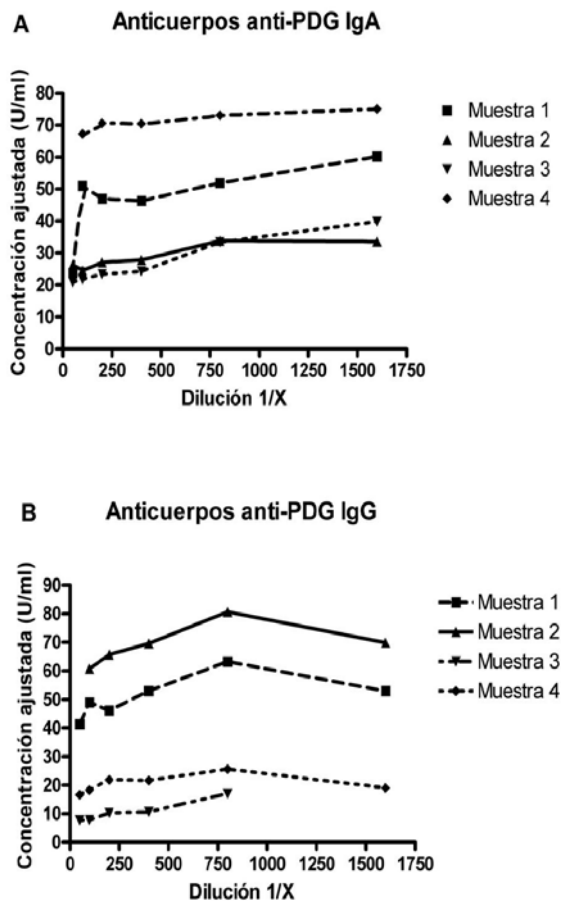
En el ensayo de paralelismo entre muestras, se trabajó con las mismas muestras de suero, partiendo de diluciones seriadas, según los factores 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600, empleando el diluyente provisto por el kit. Luego de ejecutar la técnica de ELISA para determinación de anticuerpos PDG-A y PDG-G, según las recomendaciones del fabricante, se

Figura 4. Representación de la pendiente de las rectas derivadas de los ajustes de regresión lineal.

► A. Representación de la pendiente de las rectas derivadas de los ajustes de regresión lineal ponderada para las muestras M1- M4 y la curva estándar (CE), en el trabajo con el kit PDG-A. Se compararon las pendientes de M1-M4 con la pendiente CE para analizar desvíos del paralelismo por la prueba de ANOVA de un factor. * $p < 0,01$. ** $p < 0,05$.

► B. Representación de la pendiente de las rectas derivadas de los ajustes de regresión lineal ponderada para las muestras M1- M4 y la curva estándar (CE) en el trabajo con el kit PDG-G. Se compararon las pendientes de M1- M4 con la pendiente CE para analizar desvíos del paralelismo por la prueba de ANOVA de un factor. * $p < 0,01$.

interpolaron los valores de DO de cada nivel de dilución en la curva estándar y se corrigió por factor de dilución: la concentración final de analito calculada a partir de este procedimiento inverso debería ser consistente en el rango de diluciones explorado y no exhibir desviaciones por fuera de valores prefijados para el coeficiente de variación (CV), cuyo valor tolerable en este trabajo se tomó como $CV < 20\%$. Las concentraciones obtenidas para M1-M4 a partir de cada uno de los seis niveles de dilución se representaron en una gráfica para examen de la tendencia de los datos.

Figura 5. Concentración ajustada de anticuerpos.

► A. Trazado de la concentración ajustada calculada por interpolación para seis diluciones seriadas de cada muestra M1- M4. Se trabajó con el kit PDG-A. 1/X: factor de dilución.

► B. Trazado de la concentración ajustada calculada por interpolación para seis diluciones seriadas de cada muestra M1- M4. Se trabajó con el kit PDG-G. No se representa para la muestra 3 el punto correspondiente a la dilución 1/1600 al estar la señal por debajo del límite de cuantificación. 1/X: factor de dilución.

Resultados

Se procesaron cuatro muestras de suero de adultos, M1-M4, según el esquema descrito en el apartado anterior. En las figuras 1 (panel izquierdo) y 3A se puede apreciar que, a partir del análisis del coeficiente de Hill, existe diferencia significativa en el comportamiento frente a los inmunorreagentes del kit PDG-A para la muestra M1 y los calibradores (3,23 vs 0,92, respectivamente, $p < 0,01$). Luego de ajustar a una recta los datos por medio de la transformación Logit - Log y efectuar una regresión lineal ponderada, tal como se muestra en la figura 1 (panel derecho), se encontró que las pendientes tanto de M1 (2,44, $p < 0,01$) como de M4 (1,60; $p < 0,05$) difieren de la pendiente de la curva estándar (0,93) (Figura 4A). Se puede asumir que M1 no reacciona de manera predecible con elementos del kit PDG-A, según los métodos de análisis de paralelismo basados sobre

la comparación de parámetros, empleando un modelo lineal y no lineal. Al indagar en el paralelismo entre muestras por el cálculo inverso de las concentraciones (Tabla 1), M1 y M3 exhiben una variabilidad en sus resultados (CV = 26,31 % y CV = 28,05 %) inaceptablemente alta en relación con el valor prefijado de $CV \leq 20$ %. En efecto, la tendencia creciente de las concentraciones calculadas para M1 y M3 con el factor de dilución (Figura 5A) sugiere que se está liberando al analito de la influencia de algún interferente con el que interacciona de forma inespecífica y que, a su vez, disminuye la posibilidad de unión con elementos de detección del ensayo. Estos hallazgos para M1 ponen en duda la confiabilidad de los resultados semicuantitativos que puedan obtenerse a partir su procesamiento con el kit PDG-A, por lo menos en el rango de las diluciones examinadas. En el caso del kit PDG-G, los coeficientes de Hill de las curvas 4PL no difieren significativamente al comparar el paralelismo entre M1 - M4 y la curva estándar (Figura 2, panel izquierdo y Figura 3B). Sin embargo, en la regresión lineal se encuentra que las pendientes de las rectas para M1 (1,62) y M3 (1,69) no son equivalentes ($p < 0,01$; Figura 2 panel derecho y Figura 4B) a la pendiente de los calibradores (0,76). En este caso, existe incongruencia entre las curvas logísticas y las rectas de la transformación Logit - Log. Se revela en este último ajuste una exagerada sensibilidad en la detección de desvíos del paralelismo al combinarse con la metodología de ANOVA: si se juzga el aspecto de las rectas en la figura 2, tanto M1 como M3 no parecen tener una pendiente tan disímil de la curva estándar como para descartar la hipótesis de reactividad comparable entre las muestras y calibradores. En la prueba de paralelismo entre muestras (Tabla 2), nuevamente M3 se destaca como la muestra que, al presentar un CV = 35,45 %, parece tener una matriz de composición tal que afecta de manera importante la señal. La tendencia general para las concentraciones de M1 - M4 es creciente, al menos hasta un nivel de dilución 1/800, después de la cual disminuyen. Este efecto se confirma en la figura 5B, donde se registra una oscilación del trazado muy acusada para M1 y M2 en relación al resto de las muestras. No obstante, se verifica en el último punto lo que parece ser una corrección de la interferencia con la dilución creciente, que termina atenuando el impacto sobre el CV (14,64 y 10,61 %, respectivamente).

En contraste, las razones metodológicas no permitieron interpolar los datos del último punto para M3, razón que tal vez justifique el incremento excesivo de su CV% a un nivel superior al tolerable.

Discusión

En etapas tempranas del desarrollo de las pruebas de ELISA es imprescindible emprender un estudio sistemático de la especificidad, selectividad, sensibilidad, determinación de la dilución mínima requerida y límites de cuantificación superior e inferior del ensayo.¹⁰ En el caso de kits adquiridos en el comercio, el interés puede orientarse a verificar de manera operativa las especificaciones técnicas declaradas por el fabricante¹⁵, examinar las variaciones entre lotes de reactivos o la validez del procedimiento recomendado. Es sabido que la adopción in-

Tabla 1. Concentraciones ajustadas de los anticuerpos IgA anti péptidos de gliadina desaminados: análisis del paralelismo entre muestras a partir de diluciones seriadas (1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600).

Muestras	Media (U/ml)	DE (U/ml)	CV %
1	46,70	12,29	26,31
2	28,87	3,91	13,57
3	27,23	7,64	28,05
4	71,31	2,94	4,12

► DE, desvío estándar; CV %, coeficiente de variación; anti-PDG, anti péptidos desaminados de gliadina; IgA, inmunoglobulina A.

discriminada de kits comerciales puede traer aparejada la generación de resultados confusos o discordantes con el resto de las pruebas que componen un panel diagnóstico y que causan muchas veces desconcierto en el profesional de la salud responsable de la toma de decisiones con base en los resultados serológicos. Es pertinente abordar estas cuestiones tomando como eje el estudio del paralelismo, si se pretende determinar que un inmunoensayo cumple con los fines para los que ha sido desarrollado.⁷

Aunque la importancia del paralelismo es reconocida en la industria farmacéutica y biotecnológica como requisito previo a la determinación de la potencia relativa de un producto, no existe consenso en cuanto a la forma de conducir los experimentos ni en los criterios de aceptación o rechazo para los bioensayos de diagnóstico. Más bien, se plantea en la literatura del tema una serie de lineamientos generales y recomendaciones, que derivan de distintas posturas, no siempre complementarias. Esto atenta contra la elaboración de procedimientos operativos estándar necesarios para generalizar el estudio del paralelismo en el área de inmunquímica.¹

El paralelismo como objeto de indagación en inmunoensayos ha sido escasamente explorado: estudios recientes plantean interrogantes acerca de la validez de las pruebas de significancia basadas sobre el valor *p*, tal como se aplica en el primer enfoque de este trabajo. En efecto, se ha puesto en duda que los resultados de las pruebas de comparación de parámetros considerados arbitrariamente relevantes, tales como la pendiente de Hill correlacionen con el fenómeno de equivalencia en la reactividad de muestras y estándares.¹⁶ Si bien éste se considera un parámetro de curvatura fundamental, hay posturas que reformulan el análisis en términos de la inclusión de las asíntotas superior e inferior del modelo 4PL para conseguir una descripción más completa de la curva.^{17,18} Más aún, la elección del ajuste parece condicionar los resultados: esto lo demuestra la falta de congruencia entre los resultados de las transformaciones Logit - Log y los modelos 4PL en este trabajo, evidente en el análisis del paralelismo para el kit PDG-G. En ese caso, la comparación de pendientes de las rectas parece tener una sensibilidad exagerada en la detección de desvíos del paralelismo que tal vez no se destaquen en la inspección visual. Razones del mismo orden llevaron a algunos autores a inclinarse por la valoración de la forma de las curvas 4PL como recurso

más conveniente en lugar de aplicar la técnica de ANOVA.¹¹ Esto plantea la controversia acerca de si es metodológicamente válida la comparación visual de las curvas 4PL o rectas, por el grado de subjetividad que implica el procedimiento¹¹, o más bien, si se debería seguir un análisis sistemático basado sobre la prueba de ANOVA.

Los resultados de este trabajo indican que M1 no reacciona de manera similar a los estándares para el kit PDG-A, así como tampoco lo hace M3 con el kit PDG-G. Al comparar los dos enfoques usados para evaluar el paralelismo, algunas conclusiones pueden ponerse de relieve. Si se da prioridad a la evaluación gráfica de las curvas 4PL, las diferencias presuntamente significativas del ANOVA parecen intrascendentes, razón por la que se recomienda dejar de lado las pruebas basadas sobre la hipótesis de similitud de parámetros en favor de la comparación visual de las curvas logísticas. No se sugiere el uso de la transformación Logit - Log porque su exagerada sensibilidad podría conducir a desestimar ensayos potencialmente útiles. En una segunda etapa, se puede complementar con el enfoque basado sobre el CV%, teniendo en cuenta que niveles de exigencia demasiado estrictos (CV < 10%) serían inapropiados en el contexto de un plan de validación aplicado a inmunoensayos.⁷ Los objetivos tal vez deban dirigirse a generar resultados semicuantitativos lo suficientemente confiables como para proveer de respaldo sólido a las conductas terapéuticas o actitudes médicas dependientes de su empleo.²

El acotado número de muestras procesadas en este estudio se relaciona con la dificultad de hallar positividad simultánea para ambas pruebas en niveles de anticuerpos, que permitan ejecutar seis diluciones seriadas e interpolar con comodidad la señal en las curvas de calibración, alejadas de efectos indeseables que pueda introducir sobre el CV % la proximidad a los límites de cuantificación superior e inferior.⁷ Por otro lado, algunos autores señalan la pérdida de precisión que paradójicamente se introduce al incorporar mayor número de muestras al diseño del ensayo.²⁰ Atendiendo a estas cuestiones y para hacer más intuitiva la interpretación gráfica de los resultados, es que se resolvió trabajar con las muestras M1- M4.

Sabiendo que todo ELISA tiene problemas de especificidad en su diseño y que existe siempre algo de incertidumbre acerca de la identidad de los elementos que dan origen a la señal¹⁹, el análisis de paralelismo entre muestras y estándares permite la

Tabla 2. Concentraciones ajustadas de los anticuerpos anti-PDG IgG: análisis de paralelismo entre muestras a partir de diluciones seriadas (1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600).

Muestras	Media (U/ml)	DE (U/ml)	CV %
1	50,89	7,45	14,65
2	69,30	7,35	10,61
3	10,65	3,78	35,45
4	20,49	3,22	15,71

► DE, desvío estándar; CV %, coeficiente de variación; anti-PDG, anti - péptidos desamidados de gliadina; IgG, inmunoglobulina G.

evaluación indirecta de este aspecto. En particular, frente a un inmunoensayo en el que las muestras evaluadas presenten reiterados desvíos del paralelismo con respecto a los estándares, se puede asumir que los problemas de especificidad ameritan el reemplazo de algún componente del kit, o bien, el cambio en la elección de la fuente a partir de la cual se prepara el material de referencia.

En caso de que surja la necesidad de introducir variantes en el ELISA debido a que su desempeño en las pruebas de paralelismo entre muestras no cumple con los criterios de aceptación prefijados, una serie de medidas dirigidas a extinguir interacciones inespecíficas se pueden poner en práctica: optimizar la composición de los reactivos del kit manipulando los niveles de aditivos (concentración de detergentes, dilución de colorantes) o adecuando la mínima dilución requerida de la muestra. Por otro lado, si el problema reside en la interacción específica del analito con componentes de la matriz, posiblemente deba plantearse un abordaje más radical que implique adaptar el formato del ELISA: la introducción de pasos de pretratamiento para extraer el analito en ciertas matrices biológicas ha demostrado ser un recurso útil.

En resumen, es nuestra intención motivar la discusión acerca del paralelismo en inmunoensayos de diagnóstico y brindar al bioquímico elementos de análisis que le permitan adoptar una postura crítica a la hora de desarrollar un plan de verificación o validación de los insumos que emplea en su ejercicio profesional.

La búsqueda continua de mejora y la interacción con profesionales de la estadística para evaluar aspectos ligados a su quehacer es esencial, si se pretende garantizar la calidad de las prestaciones del laboratorio clínico en entornos altamente competitivos.

Referencias bibliográficas

- Andreasson U, van Waalwijk PL, van Doorn A, Blennow L, Chiasserini K, Engelborghs D et al. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Fronti Neurol.* 2015; 6:179.
- Stevenson LF, Purushothama S. Parallelism: considerations for the development, validation and implementation of PK and biomarker ligand-binding assays. *Bioanalysis.* 2014; 6(2):185-98.
- Walker MM, Ludvigsson JF, Sanders DS. Coeliac disease: review of diagnosis and management. *Med J Aust.* 2017; 207(4):173-8.
- Tye-Din JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr.* 2018; 6:350.
- Monzani A, Rapa A, Fonio P, Tognato E, Panigati L, Oderda G. Use of Deamidated Gliadin Peptide Antibodies to Monitor Diet Compliance in Childhood Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011; 53(1):55-60.
- Vahedi K, Mascart F, Mary JY, Laberrenne JE, Bouhnik Y, Morin MC, et al. Reliability of antitransglutaminase antibodies as predictors of gluten-free diet compliance in adult celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98(5):1079-87.
- Valentin MA, Ma S, Zhao A, Legay F, Avrameas A. Validation of immunoassay for protein biomarkers: bioanalytical study plan implementation to support pre-clinical and clinical studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 55(5):869-77.
- Lee JW. Method validation and application of protein biomarkers: basic similarities and differences from biotherapeutics. *Bioanalysis* 2009; 1:1461-74.
- Fleetwood K, Bursa F, Yellowlees A. Parallelism in practice: approaches to parallelism in bioassays. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2015; 69(2):248-63.
- Tu J, Bennett P. Parallelism experiments to evaluate matrix effects, selectivity and sensitivity in ligand-binding assay method development: pros and cons. *Bioanalysis.* 2017; 9(14):1107-22.
- Plikaytis BD, Holder PF, Pais LB, Maslanka SE, Gheesling LL, Carlone GM. Determination of parallelism and nonparallelism in bioassay dilution curves. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(10):2441-7.
- Ciotti S, Purushothama S, Ray S. What is going on with my samples? A general approach to parallelism assessment and data interpretation for biomarker ligand-binding assays. *Bioanalysis* 2013; 5(16): 1941-3.
- O'Connell MA, Belanger BA, Haaland PD. Calibration and assay development using the four-parameter logistic model. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1993; 20 (2):97-114.
- Rodbard, D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* 1974; 20:1255-70.
- Fischer SK, Carrasco-Triguero M, Hong K, Good J, Davancaze T, Nguy T, Li J, Darbonne W, Morimoto A, Zhu Y. Commercial biomarker assays: friend and foe. *Bioanalysis.* 2016; 8(22): 2351-62.
- Gottschalk PG, Dunn JR. Measuring parallelism, linearity, and relative potency in bioassay and immunoassay data. *J Biopharm Stati.* 2005; 15: 437-63.
- Jonkman, J, Sidik, K. Equivalence testing for parallelism in the four-parameter logistic model. *J Biopharm Stat.* 2009; 19 (5):818-37.
- Sidik K, Jonkman JN. Testing for parallelism in the heteroscedastic four-parameter logistic model. *J Biopharm Stat.* 2016; 26(2):250-68.
- Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm Res.* 2006; 23(2), 312-28.
- Yang H, Kim HJ, Zhang L, Strouse RJ, Schenerman M, Jiang XR. Implementation of parallelism testing for four-parameter logistic model in bioassays. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2012; 66(3):262-9.